云 南 植 物 研 究 2001，23（4）：497～503
Acta Botanica Yunnanica

前体对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮合成的影响*

吕东平[1]，赵德修[1**]，黄 艳[1,2]，赵 乔[3]
（1 中国科学院植物研究所，北京 100093；2 中国科学院化工冶金研究所，北京 100093；3 中国农业大学，北京 100094）

摘要：在水母雪莲（*Saussurea medusa* Maxim）细胞悬浮体系中加入苯丙氨酸、肉桂酸和乙酸钠 3 种前体，结果显示，3 种前体均能促进细胞内黄酮的生物合成，但它们对细胞的生长也有一定的抑制作用。实验表明，3 种前体的添加时间均以第 6 天为宜。苯丙氨酸的最佳添加浓度为 0.05 mmol/L，肉桂酸、乙酸钠的最佳添加浓度都是 0.1 mmol/L。3 种前体中，难溶于水的肉桂酸对黄酮合成的促进作用最强，它可使培养物的黄酮产量高达 1801 mg/L，是对照 1.98 倍。苯丙氨酸、乙酸钠两种前体协同添加，比它们单独加入 更能促进细胞的黄酮合成。

关键词：水母雪莲；前体；细胞悬浮培养；黄酮生物合成
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2001)04－0497－07

The Effect of Precursor Feeding on Flavonoids Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Saussurea medusa*

LU Dong－Ping[1]，ZHAO De－Xiu[1**]，HUANG Yan[1,2]，ZHAO Qiao[3]
（1 *Insitute of Botany*，*Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100093，China；
2 *Institute of Chemical Metallurgy*，*Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100080，China；
3 *China Agricultural University*，Beijing 100080，China）

Abstract：The effect of three precursors on flavonoids biosynthesis in cell suspension cultures of *Saussurea medusa* Maxim has been studied. The results show that all these precursors can promote the flavonoids biosynthesis. The optimum time for precursor feeding（OTPF）is the 6th day during the cell culture. L－pheylalanine，cinnamic acid and NaAc have the most significant promoting effect on flavonoids formation at the concentration of 0.1 mmol/L，0.05 mmol/L and 0.1 mmol/L respectively. Of the three precursors，cinnamic acid is the most effective. The maximum flavonoids production reached 1 801 mg/L，1.98 times as that of the control. When L－pheylalanine and NaAc were combined to be added，they have a more significant promoting effect than they were added respectively.

Key words：*Sassurea medusa*；Precursor；Cell suspension culture；Flavonoids biosynthesis

水母雪莲（*Saussurea medusa* Maxim）是一种名贵药材，具有散寒除湿，活血通络，抗癌，抗炎，抗疲劳等功效，可治疗风湿性关节炎，妇女月经不调，痈疮肿毒，高山不适应

* 基金项目：国家自然科学基金（No. 39570862）资助
** 通讯联系人 Author for correspondence. E－mail address：zhaodx @ns. ibcas. ac. cn
收稿日期：2000－10－22，2001－02－22 接受发表
作者简介：吕东平（1977－）男，内蒙古人，在读硕士研究生，主要从事植物细胞工程学的研究。

等症（李观海等，1980）。它含黄酮、生物碱、挥发油、多糖等多种有效成分，其中黄酮为主要成分（梁文生等，1996；王本富等，1996）。雪莲生长环境特异，天然生长缓慢，人工栽培困难，长期的掠夺性采挖，已使得雪莲成为濒危物种。应用现代生物技术进行雪莲细胞培养来生产黄酮类化合物既可以满足临床上对雪莲药物的需求，又可以保护自然资源，维护生态环境。

在植物细胞培养中加入目的化合物生物合成的前体是提高有效次生代谢产物产量的有效途径。在许多培养细胞中都取得了很好的效果。如 Xu 等（1998）在 *Rhodiola sachalinensis* 的悬浮培养中，加入毛柳苷生物合成的的前体 L－Tyrosol，可使毛柳苷的产量提高 4 倍。Van Uden 等（1990）在金黄亚麻细胞悬浮培养中，加入前体苯丙氨酸，细胞中 5－甲氧基鬼臼毒素的含量增加了 3～5 倍。在 水母雪莲细胞黄酮的生物合成过程中，苯丙氨酸经 PAL 酶催化生成肉桂酸，肉桂酸又经多步催化，其产物与乙酸的衍生物结合生成查耳酮，在此基础上又合成了其它黄酮（李雄彪等，1992）。本文研究黄酮生物合成的 3 个前体苯丙氨酸、肉桂酸和乙酸对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮生物合成的的影响，为水母雪莲细胞大量培养，工业化生产黄酮类化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用由本实验室筛选得到的水母雪莲（*Saussurea medusa* Maxim）高产黄酮细胞系。

1.2 培养方法

悬浮培养的培养基为 MS＋NAA（2.0 mg/L）＋6－BA（0.5 mg/L），蔗糖浓度 3%，高压灭菌前 pH 调至 5.8。38.9～58.4 μmol·m^{-2}·s^{-1} 光照条件下振荡培养，摇床转速 120 r/min，培养温度为 25 ±1℃，培养物每 12 d 继代一次，接种量约 2.0 g FW/L，所有实验作 2 个重复。实验采用 100 mL 三角瓶，每瓶盛 25 mL 培养基。

1.3 前体的添加

不同浓度的苯丙氨酸、肉桂酸和乙酸钠经过滤灭菌后，在细胞培养的不同阶段，添加到悬浮培养体系中。采用梯度稀释法配制不同浓度的上述 3 种前体溶液，即先配高浓度溶液，该前体低浓度溶液由高浓度溶液稀释而得到。

1.4 细胞生长量的测定

培养物经 400 目不锈钢筛网过滤，无离子水洗涤，称量后得鲜重；60℃烘干至恒重得干重。

1.5 黄酮的分析

总黄酮采用分光光度法（关家彦等，1995）在 510 nm 处测定 OD 值，仪器采用 Hitachi 557 Double Wavelength/Double Beam Spectrophotometer（Hitachi Co. Ltd. Tokyo）。

2 结果与讨论

2.1 雪莲悬浮培养物的生长特征

由图 2 可见，悬浮培养过程中，黄酮合成与细胞生长相耦联。从接种到培养的第 3 天，为细胞生长的延迟期。到第 12 天，细胞的指数生长期结束，细胞干重和黄酮合成量

在这时都达到最大值，分别为 17.38 gDW/L 和 901.53 mg/L；随后，细胞进入静止生长期，细胞干重和总黄酮含量都不断下降，到第 15 天时分别为 13.95 gDW/L 和 523.69 mg/L。细胞在悬浮培养的第 6～9 天内，黄酮的合成速率最高，达 124.7 $mg.L^{-1}/d^{-1}$。测定发现，在培养的第 12 天，培养液中的黄酮含量很少，低于总含量的 4%；第 16 天时，细胞有一定数量的死亡破碎，培养液中的黄酮稍有增加，但不超过总含量的 8%（数据未显示），这说明合成的黄酮外排量很小，主要积累在细胞内。

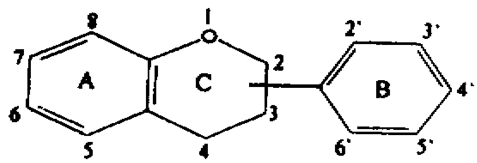


图 1　黄酮类化合物的基本结构

Fig.1　The fundamental structure of flavonoids

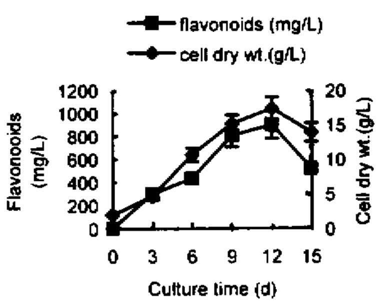


图 2　水母雪莲悬浮培养细胞生长、黄酮合成动态曲线

Fig.2　Time course of cell growth，flavonoids formation in cell suspension culture of *S. medusa*

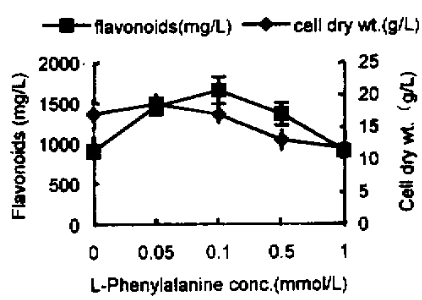


图 3　外源苯丙氨酸浓度对水母雪莲悬浮培养细胞生长、黄酮产量的影响

Fig.3　Effect of concentration of L－phenylalanine on cell growth and flavonoids production in cell suspension culture of *S. medusa*

2.2　前体添加浓度的影响

次生产物是通过一系列代谢过程产生的，其代谢过程中的中间产物加入培养基后，往往能促进终产物的生成。但许多外源前体的加入又会抑制植物细胞的生长（Robins 等，1991），从而也最终影响了终产物的产量。但就许多前体而言，存在一个前体的最佳添加浓度 OCPF（Optimum Concentration for Precursor Feeding）。我们以雪莲细胞悬浮培养生产黄酮为例来说明这一概念。设外源前体浓度为 c，由外源前体对黄酮合成的促进作用而引起的黄酮产量的提高量 P_1 符合函数

$$P_1 = f_1(c);$$

同样，因前体抑制细胞生长而引起的黄酮产量的降低量 P_2（有些前体能促进细胞生长，此时 P_2 取负值）符合函数 $P_2 = f_2(c)$；

我们定义 $\Delta P = P_1 - P_2 = f_1(c) - f_2(c) = f(c)$；
当 $f(c) \leqslant 0$ 时，这样的前体对黄酮合成的促进作用太小或者是对细胞的毒性太大，故不研究其 OCPF，而当 $f(c) \geqslant 0$ 时，添加前体的培养物的黄酮产量 P 与对照的产量 P_0 满足方程 $P = P_0 + \Delta P = P_0 + f(c)$.
我们把黄酮产量 P 的最大值 P_{max} 对应的外源前体的添加浓度 c 称作前体的最佳添加浓度 OCPF。也即，当 c = OCPF 时，$P = P_0 + f(c) = P_{max}$
这就是说，当所加前体的浓度为 OCPF 时，细胞培养物的终产物的产量最大。Xu 等（1998）在培养 *Rhodiola sachalinensis* 生产毛柳苷的实验中，加入不同浓度的前体 L－Tyrosol（从 0.05 mmol/L 到 1 mmol/L），实验证明随着外源前体物 L－Tyrosol 浓度的提高，对植物细胞毒性不断增大，同时，细胞内目标化合物毛柳苷的含量也随之增加。前体浓度为 0.5 mmol/L 时，毛柳苷的产量最高。也即，细胞生产毛柳苷的最佳添加浓度 OCPF 是 0.5 mmol/L。在我们的实验中，我们把黄酮生物合成的前体苯丙氨酸、肉桂酸、乙酸钠在细胞培养的第 6 天分别加入到水母雪莲的悬浮培养体系中，结果显示，它们对细胞生长和黄酮合成的影响有所不同，这 3 种前体的最佳添加浓度 OCPF 也不尽相同。

苯丙氨酸在植物体内可以通过参与蛋白质的合成和作为碳源和氮源来影响细胞的生长。在植物细胞的次生代谢中，苯丙氨酸又是一个代谢中间体，它是合成生物碱、木质素等次生代谢物质的前体（欧阳光察等，1988）。Zenk 等（1977）在培养鞘蕊花（*Coleus blunmei*）时发现 3 mmol/L 的苯丙氨酸既可以促进细胞的生长，又使迷迭香酸的含量增加一倍。苯丙氨酸还可以促进紫草细胞萘醌类化合物的合成（Mizukami 等，1977），烟草细胞多酚的合成（Sahaai 等，1984）等。在黄酮的生物合成中，苯丙氨酸也是一个非常重要的前体，它构成了黄酮类化合物 B 环和 C 杂环的 C－2、C－3 和 C－4（李雄彪等，1992）。实验结果（图 3）表明，较低浓度的外源苯丙氨酸（0～0.05 mmol/L）对雪莲细胞生长的影响并不明显，当苯丙氨酸的浓度为 0.05 mmol/L 时，培养细胞的干重为 18.62 g/L，是对照的 1.09 倍。但浓度超过 0.05 mmol/L 时，雪莲细胞的生长将会受到明显抑制。图 3 还表明，苯丙氨酸的 OCPF 为 0.1 mmol/L，在该浓度下，细胞的黄酮产量最高，为 1 654 mg/L,是对照的 1.83 倍。

乙酸是黄酮生物合成的重要前体之一，黄酮化合物的 A 环由 3 个乙酸单位构成（李雄彪等，1992）。图 4 表明，乙酸钠可以促进雪莲细胞的黄酮合成，同时，乙酸钠对悬浮培养细胞的生长也有一定的抑制作用，且抑制作用随乙酸钠浓度的提高而增强。乙酸钠的 OCPF 为 0.1 mmol/L 乙酸钠，在该浓度下，培养物的黄酮产量可高达 1437 mg/L，是对照的 1.61 倍。

肉桂酸是苯丙氨酸的衍生物，在黄酮生物合成途径中，苯丙氨酸裂解酶催化苯丙氨酸生成肉桂酸（李雄彪等，1992）。肉桂酸在水中的溶解度很低，因此，如果直接添加到培养基中，很难被细胞吸收转化，因而不能明显提高黄酮的含量（数据未显示）。对于这类前体物，有的研究者采用双相培养体系来解决这一问题，然而，因为有机相的存在，植物细胞的生活力会大大下降，酶的活力也会随之受到影响，使得植物细胞几乎不能转化该类前体（Beiderbeck 等，1988）。另一种解决这类问题的方法是，以极性络合物为载体来运载该类前体以参与前体的转化反应，如 Woerdenbag 等（1990）利用环糊精为载体，使难

溶前体松柏醇在培养基中的浓度达 3 mmol/L，从而有效地提高了目的化合物鬼臼毒素的产量。同样，Woerdenbag 等（1990）还利用另一种方法，即，加入难溶前体松柏醇的葡萄糖苷——松柏苷，而使鬼臼毒素的含量大大提高。我们的实验中，用乙醇溶解肉桂酸，然后添加到雪莲细胞的悬浮培养体系中，在配制肉桂酸的乙醇溶液时，利用了梯度稀释法，这种方法的优点在于，所有实验中肉桂酸乙醇溶液的添加体积都是一样的，因此，添加的乙醇量也是一样的，均为 0.1 mL，而 0.1 mL 的乙醇对于 25 mL 培养体系中细胞生长的影响很小（数据未显示），可以忽略。而乙醇又可以与培养基混溶，从而可使肉桂酸被细胞充分吸收和转化。我们把不同浓度的肉桂酸在培养的第 6 天加入到雪莲细胞的培养物中。图 5 表明，肉桂酸可以促进雪莲细胞的黄酮合成，同时，随着肉桂酸对雪莲细胞的生长也有抑制作用，且随浓度的增大而增强。肉桂酸的 OCPF 为 0.05 mmol/L，在该浓度下，培养细胞的黄酮含量 1801 mg/L，达到最高，是对照的 1.98 倍，高于由苯丙氨酸引起的 1.83 倍。这表明，肉桂酸对雪莲细胞黄酮合成的促进作用强于苯丙氨酸。原因可能是在黄酮的生物合成过程中，肉桂酸须由苯丙氨酸经苯丙氨酸裂解酶（PAL）催化而生成，而苯丙氨酸裂解酶是黄酮生物合成过程中的一个关键酶，其活性受到多种因素的影响，所以，直接添加肉桂酸，就可以减少对苯丙氨酸裂解酶的依赖。

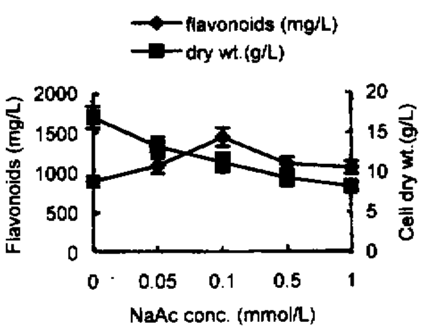


图 4　外源乙酸钠浓度对水母雪莲悬浮培养细胞生长、黄酮产量的影响

Fig.4　Effect of concentration of NaAc on cell growth and flavonoids production in cell suspension culture of *S. medusa*

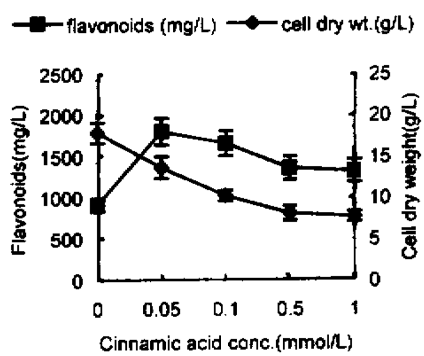


图 5　外源肉桂酸浓度对水母雪莲悬浮培养细胞生长、黄酮产量的影响

Fig.5　Effect of concentration of cinnamic acid on cell growth and flavonoids production in cell suspension culture of S. *medusa*

2.3　添加时间的影响

外源前体在细胞培养的不同时间添加，其对细胞生长的抑制作用与对次生代谢产物合成的促进作用也有所不同。类似于前体的最佳添加浓度，我们也可以定义前体的最佳添加时间 OTPF（Optimum Time for Precursor Feeding），当外源前体在 OTPF 这个时间加入时，培养物的次生代谢物的产量要高于在其它时间加入时的产量。我们在雪莲细胞培养的不同时间添加 0.1 mmol/L 的上述 3 种前体，其对细胞生长和黄酮合成的影响见图 6～7。实验表明，苯丙氨酸、肉桂酸和乙酸钠 3 种前体，在接种时加入，对雪莲细胞生长的抑制作用最大，收获的生物量分别是对照的 59%、41% 和 47%。在第 9 天加入时，收获的生物量已

接近对照。这表明前体添加越早，对雪莲细胞生长的抑制作用就越大，而越是在细胞培养的初期，细胞的初级代谢就越旺盛。这说明了可能是因为前体影响雪莲细胞的初级代谢，从而影响了细胞的生长。当这 3 种前体在第 3 天加入时，细胞的黄酮含量都超过了对照，分别为 6.8%、8.5%、7.8%（对照的含量为 5.2%），这进一步表明了雪莲细胞的黄酮合成与细胞生长相耦联，在细胞培养的第 3 天黄酮的合成已经开始。当苯丙氨酸、肉桂酸、乙酸钠 3 种前体在第 6 天添加时，细胞的黄酮产量最高，分别是对照的 1．74、1．88 和 1．51 倍。因此，细胞培养的第 6 天是这 3 种前体的 OPFT。这可能是两个方面的原因，一是在雪莲细胞悬浮培养过程中，从第 6 天到第 9 天是细胞合成黄酮速率最高的阶段，二是前体对处于这个时期细胞的生长抑制作用也相对较小。图 7 显示，在这时加入上述 3 种前体，培养细胞的生物量分别是对照的 96%、61% 和 65%。

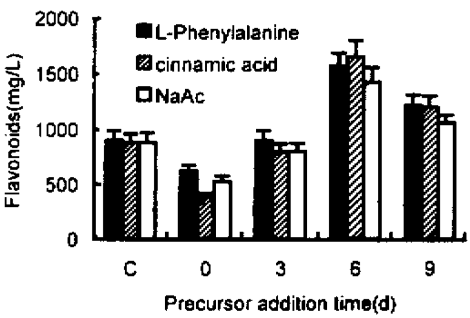


图 6　不同的前体添加时间对水母雪莲细胞悬浮培养黄酮合成影响

Fig.6　Effect of the addition time of precursor on flavonoids production in cell suspension culture of *S．medusa*

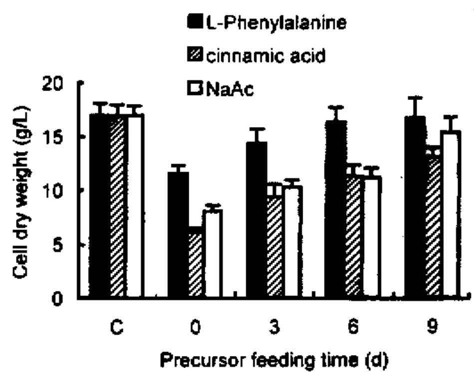


图 7　不同的前体添加时间对水母雪莲细胞悬浮物细胞生长的影响

Fig.7　Effect of the addition time of precursor on cell growth in cell suspension culture of *S．medusa*

2.4 前体协同添加的影响

余龙江等（1999）报道，在红豆杉细胞的悬浮培养过程中，同时加入 10 mg/L 的苯丙氨酸和 5 mg/L 的乙酸铵，对培养物合成紫杉醇的促进作用最强。我们按正交实验同时添加苯丙氨酸、乙酸钠，实验结果表明，苯丙氨酸和乙酸钠两种前体同时添加，对于雪莲细胞黄酮合成的促进作用强于它们单独加入。表 1 显示，同时加入 0.1 mmol/L 的苯丙氨酸和 0.1 mmol/L 乙酸钠，培养物的黄酮产量为 1 725.93 mg/L，分别是它们单独加入的 1.05 倍和 1.21 倍。而将苯丙氨酸和肉桂酸，肉桂酸和乙酸钠，苯丙氨酸、肉桂酸和乙酸钠分别进行协同添加，培养物的黄酮产量都较肉桂酸单独添加要低（数据未显示），其中的原因需进一步探讨。

表 1　苯丙氨酸和乙酸钠协同添加对水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮产量的影响

Table 1　Effect of combined addition of L－pheylalanine and NaAc on cell growth and flavonoids production in cell suspension culture of *S. medusa*

Combined precursor Concentration (phe＋NaAc)（mmol/L）	Cell dry wt.（g/L）	Flavonoids production（mg/L）	Flavonoids content（%）
0.1＋0	17.03±1.26	1649.07±109.67	9.68±0.58
0＋0.1	11.27±0.79	1451.23±85.59	12.88±1.02
0＋0.1	17.00±1.37	889.65 ±89.21	5.23±0.36
0.025＋0.025	16.28±1.63	1088.69±113.98	6.68±0.72
0.05＋0.05	14.43±1.04	1495.79±103.23	10.36±1.02
0.1＋0.1	12.87±1.28	1725.93±156.29	13.41±1.29
0.25＋0.25	10.23±0.88	1487.54±103.76	14.54±1.35
0.5＋0.5	9.68±0.94	1399.71±97.26	14.46±1.07

〔参 考 文 献〕

王本富，路杰，关家彦，1996. 天山雪莲注射液提取工艺的考察［J］. 中国药学杂志，**31**（5）：299—301

关家彦，王玮文，马慕提等，1995. 天山雪莲浸提液制备工艺的考察［J］. 沈阳药科大学学报，**12**（3）：209—211

余龙江，李为，梅兴国等，1999. 前体促进紫杉醇生物合成的研究［J］. 生物技术，**9**（1）：4—7

李观海，刘发，赵荣春，1980. 雪莲对大鼠实验性关节急性炎症的作用［J］. 药学学报，**15**：368—370

李雄彪，张金忠，1992. 简明植物生物化学［M］. 天津：南开大学出版社，341—344

欧阳光察，薛应龙，1988. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及调控［J］. 植物生理学通讯，**24**（3）：9—16

梁文生，柴进，1996. 雪莲通脉丸治疗偏瘫 82 例报告［J］. 江苏中医，**17**（1）：14

Beiderbeck R，Knoop B，1998. Medical and Aromatic Plants I［M］. Berlin－Heidelberg－ New York－London－Paris－Tokyo：Springer－Verlag，123—125

Mizukami H，Konoshima M，Tabata M，1977. Effect of nutritional factors on shickonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures［J］. *Phytochemistry*，**16**：1183—1186

Robins R J，Parr A J，Bent E G，*et al*，1991. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures［J］. *Planta*，**183**：185—195

Sahaai O，Shuler M，1984. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabaca*［J］. *Biotechnol Bioeng*，**26**：111—120

Van Uden W，Pras N，Malingre T M，*et al*，1990. On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle［J］. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*，**20**（2）：81—87

Woerdenbag H J，Van Uden W，Frijilink H W，*et al*，1990. Increased podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* cell suspension cultures after feeding coniferyl alcohol as β－ cyclodextrin complex［J］. *Plant Cell Report*，**9**：97—100

Xu J F，Liu C B，Han A M，*et al*，1998. Strateries for the improvement of salidroside production in cell suspension cultures of *Rhodiola sachalinensis*［J］. *Plant Cell Report*，**17**：288—293

Zenk M H，1977. Production of rosmarinic acid by cell suspension cultures of *Coleus blunei*［J］. *Natur－ wissens Chaftem*，**64**：585